

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑫ 公開特許公報(A) 平3-118462

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)5月21日

G 01 N 27/26

7235-2G

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑭ 発明の名称 電気泳動装置

⑮ 特 願 平1-255437

⑯ 出 願 平1(1989)9月30日

⑰ 発明者 村 川 克 二 東京都分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
 ⑰ 発明者 藤 田 雅 彦 東京都分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内
 ⑰ 発明者 永 井 啓 一 東京都分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
 ⑰ 発明者 嶋 田 保 東京都分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
 ⑰ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
 ⑰ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名
 最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

電気泳動装置

2. 特許請求の範囲

1. 少なくとも1つの正極、少なくとも1つの負極、及び泳動槽を有する電気泳動装置において、該正極と負極との間に形成される電気泳動路中に少なくとも2枚の分子量分画膜が分画分子量の大きい膜から順に、又はその逆の順に設けられ、かつ該膜により前記電気泳動路が区画されていることを特徴とする電気泳動装置。

2. 前記分子量分画膜が、前記泳動槽内に少なくとも2本設けられたチューブの先端を密閉、又は内部を区画するように装着されており、さらに該チューブ内部に電極が設けられている請求項1記載の電気泳動装置。

3. 前記分子量分画膜が、前記泳動槽内に少なくとも2本設けられたそれぞれ径の異なるいずれかのチューブの先端を密閉、又は内部を区画するように装着されており、かつより径の小さい

チューブがより径の大きいチューブの内部に配設され、さらに少なくとも2本の電極が前記いずれかのチューブ内部と前記泳動槽内部に設けられている請求項1記載の電気泳動装置。

4. 前記泳動槽、又は前記チューブの少なくとも一部が光透過性の材質で形成されている請求項1、2又は3記載の電気泳動装置。

5. 前記光透過性の材質が石英ガラスである請求項4記載の電気泳動装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は電気泳動装置に関し、さらに詳しくは核酸等生体物質の分取、分析に好適の電気泳動装置に関する。

(従来の技術)

ヒト細胞に由来する遺伝子を用いる診断や分子生物学分野の研究には、核酸等の生体高分子を分子量の差を利用して分離、分取、定量する作業が不可欠である。上記目的には電気泳動法が多く用いられてきている。従来、電気泳動装置は、「ラ

ポマニアル遺伝子工学」(村松正實編、丸善社昭和63年刊)19~28頁に記載のごとく、泳動槽中に正負2つの電極が設けられ、それらの間に電気泳動用担体としてポリアクリルアミドゲルやアガロースゲル等が用いられている。上記装置においては、核酸等の分離対象分子が上記ゲル中を該分子の有する電荷により、泳動する。上記分子のゲル中での泳動速度はその分子量等分子の性質により変化するため、複数種の分離対象分子はゲル中で分離し、分取が可能となる。

上記従来の電気泳動装置には泳動用担体としてゲルが用いられるため、ゲルを調製する必要があるが、ゲル重合度等が泳動条件に影響を与えることから結果の再現性は必ずしも良好ではない。また、電気泳動後、目的の分子を確認、定量するためには、たとえばゲルを色素染色し分子量マーカ一との目視による比較、又はデンストメータによる読み取りを必要とする。

さらに、目的の分子を回収するためには、目的分子を含むゲルを切り出し、その後再び電気泳動

等によりゲルからとり出す操作を必要とする。そして回収した分子を定量するためには、該分子の溶液の吸光度や蛍光の測定を必要とする。

(発明が解決しようとする課題)

前記のごとく従来の電気泳動装置を使用した場合、得られる結果の再現性、及び操作の煩雑さに問題があり、解決が望まれた。

上記問題の解決のため、たとえば特公昭 62-115353号公報には、チューブ上記絶縁体の1つの開口末端を半透膜で閉塞することを主要な特徴とする電気泳動装置が開示されているが、ここでは目的分子の分子量より大きい分子量を有する分子、又は小さな分子量を有する分子のいずれか一方を分離、分取するのみであり、同時に複数種の分子を分離することはできない。また、分画分子量の異なる2枚の膜を使用する遠心分離方式限外濾過器が市販されている。

しかしながら、上記装置は遠心分離方式によるものであり、遠心分離器のロータ内で操作が行われること、さらに濾過にともない液量の減少が生

じやすいことなどから目的分子の迅速な定量は困難である。

したがって、本発明の目的は、良好な再現性が簡便かつ迅速な操作により得られる核酸等の分子量分画、定量、及び回収に好適な電気泳動装置を提供することにある。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは鋭意検討の結果、本発明の前記目的が下記的手段により達成されることを見出した。

すなわち、本発明は、少なくとも1つの正極、少なくとも1つの負極、及び泳動槽を有する電気泳動装置において、該正極と負極との間に形成される電気泳動路中に少なくとも2枚の分子量分画膜が分画分子量の大きい膜から順に、又はその逆の順に設けられ、かつ該膜により前記電気泳動路が区画されていることを特徴とする。

本発明に使用される上記分子量分画膜は、好ましくは分画可能な分子量がそれぞれ異なる少なくとも2枚の膜である。

該分画膜は、異なる複数の分離対象物の分子量

とその成分内容に応じて使用されるべき種類と枚数とが適宜選択される。

本発明においては、3種以上の異なる分子量成分を含む混合物を分離するのに好適に使用される。とくに、上記分子量分画膜が3枚以上使用される場合、本発明の効果は顕著に奏される。上記分画膜は泳動槽中で分画分子量の大きい順、又は必要に応じその逆の順に並ぶよう配置される。また該膜により前記泳動槽中に形成される電気泳動路はすき間なく区画される。

本発明の前記分子量分画膜はチューブに設置されることが好ましく、該分画膜はチューブの先端を密閉、又はチューブ内部をすき間なく区画するように装着される。上記チューブは少なくとも2本泳動槽内に設けられ、かつ内部に電極が設けられる。

さらに前記チューブは、径の異なる少なくとも2本のそれが、より小さい径のチューブがより大きい径のチューブの内部に位置するように設けられることが好ましい。そして少なくとも2本の電

極が、上記いずれか、好ましくはより小さいチューブ内部と前記泳動槽内部とに設けられる。

前記泳動槽又はチューブの少なくとも一部、好ましくは全部は光透過性の材質で形成されていることが光学測定手段による迅速な操作を行うために好ましい。

上記光透過性の材質は石英ガラスであることがとくに好ましい。

(作用)

本発明に使用される少なくとも2枚の分子量分画膜はそれぞれ固有の分画分子量を有する。すなわち、上記固有の分画分子量により小さい分子量を有する分子は上記膜を透過し、より大きい分子量を有する分子は透過しない。このことにより、目的とする分子の分離、分取が可能となる。

以下、第1図により本発明の作用をさらに説明する。

電気泳動装置1は、泳動槽4、分子量分画膜5、分子量分画膜6、電極2、電極3、電源14よりなる。泳動槽4は、分子量分画膜5と分子量分画膜

6により第1室4a、第2室4b、第3室4cに分けられる。分子量分画膜5と分子量分画膜6の表の面は、それぞれ第1室4a、第2室4bに面している。

ここで、分子量分画膜5の分画分子量は、目的とする分子8の分子量よりも大きく、分子量分画膜6の分画分子量は、目的とする分子8の分子量よりも小さい。分子量分画膜の枚数はここでは2枚であるが、目的とする分子の種類の数に応じて変更される。第1室4a、第2室4b、第3室4cには泳動用バッファ液7を満たしておく。異なる分子量の分子の混合物である試料を第1室4aに入れる。このバッファ液7中で試料中の分離目的分子は正負いずれかの電荷を持つ。目的とする分子が泳動されるように電極2、電極3に電源14を接続し電場をかける。例えば、負の電荷を持つ分子を泳動するとき、電極2を負に電極3を正に接続する。第1室4a中にある分子は電極2から電極3の方向へ泳動される。電極2から電極3の方向へ泳動されている分子のうち分子量分

画膜5の分画分子量よりも小さいものだけが分子量分画膜5を通過し第2室4bへと移動する。同様に第2室4bに泳動された分子のうち分子量分画膜6の分画分子量よりも小さいものだけが分子量分画膜6を通過し第3室4cへと移動する。その結果、目的とする分子8は第2室4bに単離される。分子量分画膜5の分画分子量よりも大きい分子9は第1室4aに残り、分子量分画膜6の分画分子量よりも小さい分子10は第3室4cに移動するので目的とする分子と分子量が異なる他の分子とが分離される。

また、泳動槽4の壁が光透過性の材質で構成されている場合、第1図中矢印11の方向から入射した光は泳動槽4の壁を通過する。光は矢印12の方向へ通過するのでこの光の強度を測定することにより第2室4bにある物質の吸光度が測定される。また、矢印13の方向の光の強度を測定すれば、第2室4bにある物質の蛍光が測定される。

(実施例)

以下、本発明を実施例によりする。

実施例1

前記第1図の電気泳動装置を使用し、下記の操作を行った。

分子量分画膜5にはアミコン社製、XM 300メンブレン、(分画分子量30万)、分子量分画膜6には、アミコン社製YM 30メンブレン(分画分子量3万)を使用した。泳動槽内に泳動用バッファ液(40mM Tris-HCl, 20mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA (pH9))を入れる。第1室4aに試料を加える。試料はヒトゲノムDNAのPolymerase Chain Reaction (PCR) による増幅反応産物で、ヒトゲノムDNA、121塩基対の2本鎖DNA、2種の20merのプライマー、及びdNTPなどを含む。

電極2を正に、電極3を負になるように電源14を接続し泳動開始する。濃度分極を防止するために、10分に1回10秒程度正負を入れ替え一逆方向に電圧をかけて泳動する。90分後泳動を停止する。膜に付着しているDNAを回収するため再度10秒間程度逆方向に泳動する。電気泳動の方向と逆方向の拡散による再混合を防止するために、泳動後

ただちに第2室4b中の液を回収する。この液を2-ブタノールにより抽出、濃縮した後、フェノール抽出、エタノール沈殿の操作によりDNAを精製、濃縮する。このDNAの分子量を確認するために、8%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動させ、エチジウムブロマイドで染色した。その結果、Polymerase Chain Reaction (PCR) 増幅の目的産物である121塩基対のバンド1本のみが認められ、ヒトゲノムDNAやプライマーは認められなかった。

本実施例において、ヒトゲノムDNAの Polymerase Chain Reaction (PCR) による増幅反応産物混合物のような、数万塩基対よりも大きい巨大DNAと、100塩基対程度のDNAと、プライマーのような20mer程度のDNAとdNTP等の混合物の中から目的とする100塩基対程度のDNAをゲルを用いることなく単離できた。

第1図の構成にて、分子量分面膜をn枚($n \geq 2$)にすることで、(n+1)の成分を分離、分取することができる。また、分子量分面膜が3枚以上の

本実施例では泳動中、あるいは泳動後に泳動槽15に検出用の光を入射し、透過光あるいは蛍光を測定し、泳動槽15中の目的物を定量することができた。

本実施例では泳動中あるいは泳動後に泳動槽から目的物を取り出すことなく光学的測定が行える。
実施例3

第4図、第5図の電気泳動装置を用い下記の操作を行った。

電気泳動装置23は泳動槽24と分子量分面膜25を先端につけたチューブ26、分子量分面膜27を先端に装着したチューブ28、電極29、電極30からなる。チューブ28はチューブ26の中に、チューブ26は泳動槽24の中に入れており、入れ子構造になっている。ここではチューブ26は石英ガラス製である。

本実施例において分離法は実施例1と同様である。泳動槽24、チューブ26、チューブ28はそれぞれ実施例1の第1室4a、第2室4b、第3室4cに相当する。泳動槽24中の試料の分子のうち分子量分面膜25の分画分子量よりも小さい分子がチ

場合、試料を電極のある区画の隣の区画に入れることにより、電極から発生する泡による液の対流の影響を防ぐこともできる。

実施例2

第2図及び第3図の電気泳動装置を使用して下記の操作を行った。

電気泳動装置22は、四面透明石英ガラスセルからなる泳動槽15と分子量分面膜16を先端につけたチューブ17、分子量分面膜18を先端につけたチューブ19、電極20、電極21からなる。

本実施例において分離法は実施例1と同様である。本実施例では、チューブ17、泳動槽15、チューブ19はそれぞれ実施例1の第1室4a、第2室4b、第3室4cに相当する。チューブ17中の試料の分子のうち分子量分面膜16の分画分子量よりも小さい分子が泳動槽15へ移動し、さらに分子量分面膜18の分画分子量よりも小さい分子がチューブ19へ移動する。その結果、分子量分面膜16の分画分子量よりも小さく、分子量分面膜18の分画分子量よりも大きい分子が泳動槽15に単離される。

チューブ26内へ移動し、さらに分子量分面膜27の分画分子量よりも小さい分子がチューブ28内へ移動する。その結果、分子量分面膜25の分画分子量よりも小さく、分子量分面膜27の分画分子量よりも大きい分子がチューブ26に単離される。泳動後にチューブ26を取り出し、さらにチューブ28を取り出したのちチューブ26に検出用の光を入射し、透過光あるいは蛍光を測定することでチューブ26中の分子を定量できた。

本実施例では泳動槽にサンプリングチューブ等の容器を用いることができるので、電気泳動装置に適用するために試料をあらかじめ入っていた容器から取り出す必要が無い。またチューブ26は光学的セルを構成しているため泳動後に泳動槽24からチューブ26を取り出し、さらにチューブ28を取り出すことにより、液体を移し換えることなくチューブ26中の物質の光学的計測ができた。

(発明の効果)

本発明によれば、泳動用担体にゲルを用いる必要がないので、ゲルを調製する費用、時間、労力

が省ける。目的とする分子を回収するためにゲルを切り出したり、再泳動する操作が不要になる。目的とする分子を水溶液の状態で回収することができる。また、分子量分面膜を用いているので泳動分離後の分子の位置が一定しており再現性が良くなる。泳動時間が長すぎても目的とする分子がゲルから流失しない。泳動後の分子の位置の検出のために染色の操作をする必要がない。泳動後の分子の位置の検出のための装置を必要としない。

また、泳動槽が光学セルの機能を付与することにより泳動後の分子を泳動槽から取り出すことなく光学的方法により検出することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の全体構成図を示す。

第2図は実施例2で使用した装置の断面図。

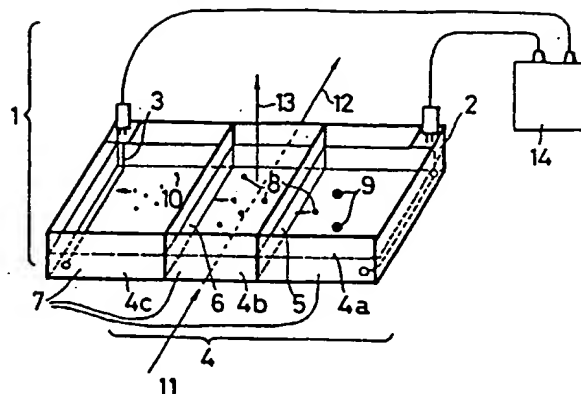
第3図は実施例2で使用した装置の見取り図。

第4図は実施例3で使用した装置の断面図。

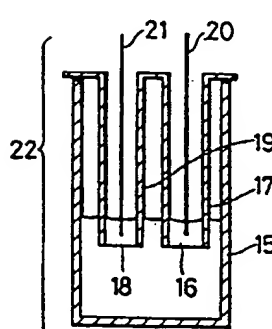
第5図は実施例3で使用した装置の見取り図。

5…分子量分面膜、6…分子量分面膜、15…光学セル。

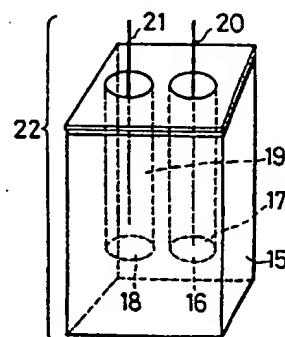
第1図



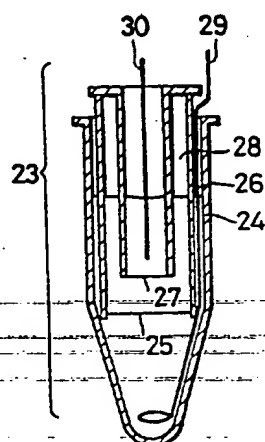
第2図



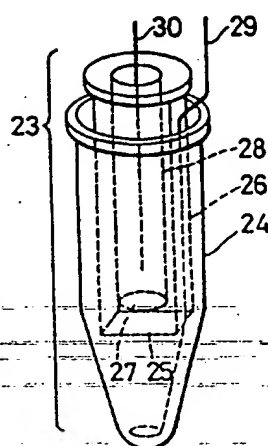
第3図



第4図



第5図



第1頁の続き

⑦発明者 神原 秀 記 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内